

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : 2 787 582
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : 98 15883

⑤① Int Cl⁷ : G 01 N 33/543, G 01 N 33/68, 33/531, C 12 Q 1/68

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 16.12.98.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 23.06.00 Bulletin 00/25.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE Etablissement de caractère scientifique techni-
que et industriel — FR.

⑦② Inventeur(s) : ROSILIO CHARLES et CAILLAT
PATRICE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : BREVATOME.

⑤④ PROCEDE DE FABRICATION D'UNE BIOPUCE ET BIOPUCE.

⑤⑦ La présente invention se rapporte à un procédé de fa-
briation d'une biopuce et à une biopuce, ladite biopuce
étant constituée notamment de sondes biologiques greffées
sur un polymère conducteur.

Le procédé de l'invention comprend les étapes
suivantes :

a) structuration d'un substrat de manière à obtenir sur ce
substrat des microcuvettes comprenant dans leur fond une
couche d'un matériau capable d'initier et de promouvoir
l'adhésion sur celle-ci d'un film d'un copolymère de pyrrole
et de pyrrole fonctionnalisé par électropolymérisation,

b) électropolymérisation collective, de manière à former
un film électropolymérisé d'un copolymère de pyrrole et de
pyrrole fonctionnalisé sur le fond desdites microcuvettes,

c) fixation directe ou indirecte d'oligonucléotides fonc-
tionnalisés par microdéposition ou technique d'impression
par jets de liquide.

FR 2 787 582 - A1



PROCEDE DE FABRICATION D'UNE BIOPUCE ET BIOPUCEDomaine technique de l'invention

La présente invention se rapporte à un procédé
5 de fabrication d'une biopuce et à une biopuce, ladite
biopuce étant constituée notamment de sondes
biologiques greffées sur un polymère conducteur.

Les dispositifs d'analyse biologique, par
exemple de type puce à ADN, constituent des outils
10 performants pour l'analyse en parallèle d'un grand
nombre de gènes ou de séquences d'ADN ou d'ARN. Leur
principe de fonctionnement repose sur la propriété
d'hybridation ou d'appariement de deux brins de
séquences complémentaires afin de reconstituer la
15 double hélice d'ADN. Pour ce faire, des sondes
d'oligonucléotides de séquence connue, immobilisées sur
un substrat support, sont mises en présence de cibles
extraites d'un échantillon biologique à analyser, et
marquées à l'aide de marqueurs fluorescents.

20 L'hybridation est ensuite repérée et la
séquence détectée par analyse de la surface de la puce
par un marqueur approprié par exemple permettant de
détecter la séquence par fluorescence.

Des technologies très différentes ont été
25 utilisées pour la réalisation de ces matrices de
sondes. Diverses techniques d'immobilisation ou de
greffage des sondes sur des substrats différents ont
fait l'objet d'études et de développements industriels
importants.

30

Etat de l'art antérieure

Il existe principalement trois méthodes
d'adressage de sondes chimiques qui constituent des

approches différentes de réalisation et d'utilisation de sondes pour différents domaines d'application. Il s'agit de l'adressage photochimique, de l'adressage mécanique, par exemple par micropipetage à l'aide d'un robot disperseur, et de l'adressage électrochimique.

Par exemple, l'adressage électrochimique peut être utilisé pour les sondes d'oligonucléotides. Pour ce faire, des matrices d'électrodes adressées individuellement sont réalisées sur un substrat de verre.

Le principe d'immobilisation des sondes biologiques repose sur un dépôt par électropolymérisation d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole substitué par un oligonucléotide (Py-ODN), portant un oligonucléotide greffé sur un noyau de pyrrole soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire d'un espaceur.

Dans le but de développer des systèmes d'analyse biologique massivement parallèles, à grande capacité ou densité de sites actifs, il est nécessaire de pouvoir adresser individuellement un nombre important de sondes.

Les procédés utilisant un adressage électrochimique nécessitent à la fois une matrice importante d'électrodes et de connexions et un multiplexeur pour indexer électriquement chacun des sites de la puce. De plus, dans ces procédés, il faut réaliser l'électropolymérisation par trempage de la puce entière successivement dans des solutions de chacun des Py-ODN contenus dans la cellule. Ces procédés sont donc limités à des puces de faible densité, c'est-à-dire d'environ une centaine de sondes, pour des applications limitées et spécifiques.

D'autres procédés ont encore été décrits dans l'art antérieur remplaçant avantageusement l'adressage électrique individuel par un adressage mécanique. Il reste cependant un inconvénient, celui de réaliser des électropolymérisations dans des microcuvettes, avec un volume de solution de l'ordre du nanolitre, pour lequel il est nécessaire de retarder l'évaporation après micropipetage de l'ensemble des sondes sur la plaquette afin que l'électropolymérisation puisse se faire.

Exposé de l'invention

La présente invention a précisément pour but de résoudre les problèmes précités en fournissant un procédé de fabrication d'une biopuce constituée notamment de sondes biologiques greffées sur un polymère conducteur, ledit procédé présentant notamment l'avantage de ne nécessiter l'utilisation que d'une seule solution d'un mélange en proportion adéquate de pyrrole et de pyrrole substitué (Py et Py-R-F ou F et une fonction chimique réactive et R est un groupement espaceur aliphatique ou aromatique) pour une seule électrodéposition collective sur l'ensemble des microcuvettes.

Le procédé de l'invention se caractérise en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) structuration d'un substrat de manière à obtenir sur ce substrat des microcuvettes comprenant dans leur fond une couche d'un matériau capable d'initier et de promouvoir l'adhésion sur celle-ci d'un film d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé par électropolymérisation,
- b) électropolymérisation collective, de manière à former un film électropolymérisé d'un copolymère de

pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé sur le fond
desdites microcuvettes, sur la couche dudit
matériau, à partir d'une solution de pyrrole et de
pyrrole fonctionnalisé, en présence de réactifs
5 chimiques appropriés pour ladite
électropolymérisation,

c) fixation directe, ou indirecte, d'une sonde
biologique sur le pyrrole fonctionnalisé, par
injection d'une solution de la sonde biologique, au
10 choix dans une ou plusieurs microcuvette(s) en
présence de réactifs chimiques nécessaires à la
fixation directe, ou indirecte, de cette sonde
biologique sur le pyrrole fonctionnalisé.

Selon l'invention, la couche du matériau
15 capable d'initier et de promouvoir l'adhésion du film
de copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé
par électropolymérisation sur celle-ci peut être une
couche métallique, l'étape a) précitée pouvant alors
comprendre une étape de dépôt de ladite couche
20 métallique sur le substrat, et une étape de dépôt d'une
couche de résine ou de polymère sur la couche
métallique et de développement ou de gravure de ladite
couche de manière à former les microcuvettes dont le
fond est constitué au moins en partie de la couche
25 métallique.

Selon l'invention, la couche métallique peut
être par exemple une couche d'or, une couche de cuivre
ou d'argent ou d'aluminium.

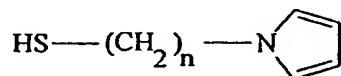
Selon l'invention, le substrat peut être par
30 exemple une plaquette de silicium, une plaquette de
verre ou un support plastique flexible si nécessaire.

Selon un autre mode de réalisation de la
présente invention, l'étape a) peut comprendre en outre

une étape de traitement de la couche d'or au fond des microcuvettes en présence d'un pyrrole fonctionnalisé par exemple avec un groupement thiol de manière à former une monocouche de pyrrole sur ladite couche
5 métallique, par exemple sur ladite couche d'or, au fond desdites microcuvettes. Cette monocouche est capable d'initier et de promouvoir l'adhésion d'un film de polypyrrole par électropolymérisation comme l'ont montré R. Simon et coll. (J. Am. Chem. Soc., 1982, 104,
10 2031). Il s'agit d'une monocouche auto-assemblée (SAM) d'un pyrrole fonctionnalisé pour son accrochage sur le fond des microcuvettes.

Selon l'invention, le pyrrole fonctionnalisé peut être un pyrrole qui présente un groupement
15 chimique permettant sa fixation par liaison covalente avec la couche métallique, et/ou avec la sonde biologique. Dans le cas de sa fixation à la couche métallique, par exemple à la couche d'or, un pyrrole fonctionnalisé avec un groupement thiol ou disulfure
20 peut également être utilisé.

Par exemple, le pyrrole fonctionnalisé avec un groupement thiol peut avoir la formule chimique suivante :



25 dans laquelle n peut avoir une valeur allant de 1 à 10, par exemple n peut être égal à 6.

Pour une électrode métallique en aluminium, on peut choisir un pyrrole fonctionnalisé avec un groupe
-COOH.

30

Selon un autre mode de réalisation de la présente invention, le substrat peut être une plaquette de silicium et la couche capable d'initier et de promouvoir l'adhésion sur celle-ci d'un film de polypyrrole par électropolymérisation, peut être une
5 couche de silane présentant un alignement de sites pyrroles. L'étape a) du procédé de la présente invention peut alors comprendre une étape de dépôt d'une couche de résine sur la plaquette de silicium,
10 ladite plaquette de silicium étant recouverte d'un film de SiO_2 , et de gravure de ladite couche de résine de manière à former les microcuvettes dont le fond est constitué au moins en partie du film de SiO_2 ; et une
15 étape de traitement des microcuvettes au moyen d'un agent de silanisation fonctionnalisé avec un pyrrole de manière à fixer, sur le film de SiO_2 , dans le fond des microcuvettes la couche de silane présentant un alignement de sites pyrroles.

Selon l'invention, l'agent de silanisation peut
20 être choisi dans un groupe comprenant le N-(3-(triméthoxy silyl)propyl) pyrrole, ou tout autre pyrrole fonctionnalisé avec un groupement $-\text{SiCl}_3$ ou $-\text{Si}(\text{OMe})_3$. Le film de SiO_2 peut être un film naturel de SiO_2 présent sur les plaquettes de silicium.

25

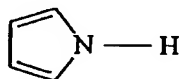
Selon l'invention, quel que soit le mode de réalisation, la résine peut être une résine photosensible, dont le masquage, l'insolation et le développement permettent de former les microcuvettes.

30 Selon l'invention, l'électropolymérisation collective de l'étape b) du procédé peut être par exemple réalisée par trempage du substrat structuré obtenu à l'étape a) précitée dans un bain

électrolytique comprenant une solution de pyrrole, de pyrrole fonctionnalisé, et de réactifs chimiques appropriés pour l'électropolymérisation, en présence d'une contre-électrode à l'électrode de travail qui
 5 trempe dans le bain électrolytique et est indépendante du substrat structuré.

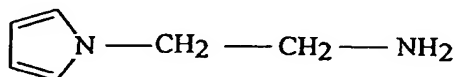
Selon l'invention, dans cette étape b), le pyrrole fonctionnalisé peut être un pyrrole comportant un groupement choisi dans un ensemble comprenant un
 10 groupement NH_2 , un groupement thiol, un groupement ester succinimide, un groupement triméthoxy silyl, un groupement carboxylique, aldéhyde et isothiocyanate.

Selon l'invention, le pyrrole fonctionnalisé par l'électropolymérisation peut par exemple être
 15 choisi parmi un des composés suivants :



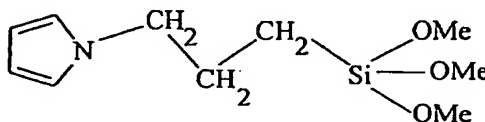
PYRROLE

20



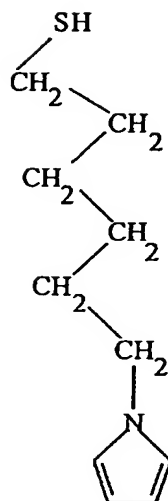
N-ETHYLAMINE PYRROLE

25



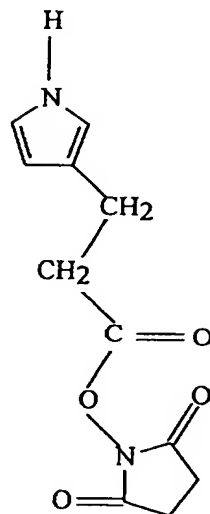
N(3-(TRIMETHOXY SILYL) PROPYL) PYRROLE

8



PYRROLE fonctionnalisé avec un thiol

5



PYRROLE fonctionnalisé en 3' par un ester succinimydyl.

Selon l'invention, le bain électrolytique peut
 10 être un mélange de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé

en proportions adéquates pour former un film présentant un nombre désiré d'unités de pyrrole fonctionnalisé. Ainsi, le procédé de l'invention permet de choisir le nombre de sondes biologiques par microcuvette, car
5 selon ce procédé, les sondes biologiques sont fixées, soit directement, soit indirectement, sur ces pyrroles fonctionnalisés.

L'étape c) suivante du procédé de l'invention consiste en une fixation directe ou indirecte d'une
10 sonde biologique sur le pyrrole fonctionnalisé.

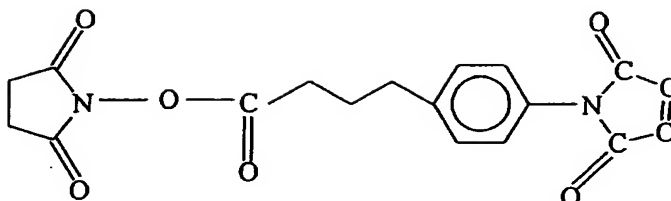
Selon l'invention, lorsque la fixation de la sonde biologique est indirecte, l'étape c) du procédé de l'invention peut comprendre en outre, avant la fixation de la sonde biologique, une fixation
15 collective d'un agent de réticulation sur le pyrrole fonctionnalisé, en présence de réactifs chimiques appropriés, ledit agent de réticulation comportant une première fonction permettant sa fixation sur le pyrrole fonctionnalisé, et une deuxième fonction permettant la
20 fixation de la sonde biologique sur ledit agent de réticulation.

Selon l'invention, l'agent de réticulation peut par exemple être un agent de réticulation bifonctionnel.

25 L'agent de réticulation peut par exemple présenter une fonction ester de la N-hydroxysuccinimide et une fonction maléimide.

Selon l'invention, l'agent de réticulation peut par exemple être choisi parmi un des composés
30 suivants :

10



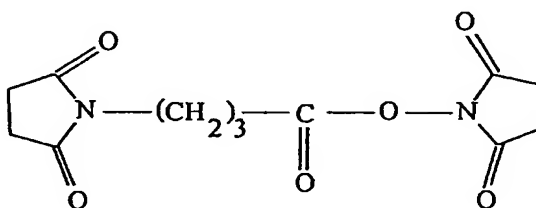
ester de N-hydroxysuccinimide

fonction maléique

SMPB

succinimidyl 4-(p-maléimidophényl)butyrate

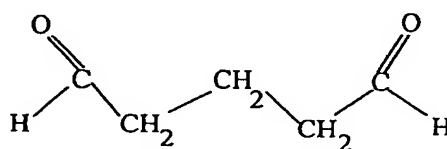
5



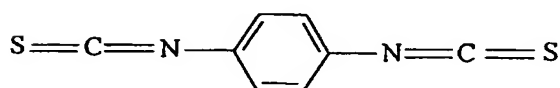
GMBS

N-maléimidobutyryloxy succinimide ester,
un dialdéhyde du type

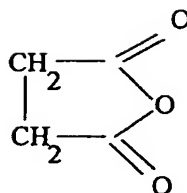
10

GLUTARALDEHYDE,
un diisothiocyanate du type

15



1,4-PHENYLENE DIISOTHIOCYANATE,



ANHYDRIDE SUCCINIQUE ou acide succinique

5 ou un dérivé de ces composés.

Tous les agents de réticulation bi-fonctionnels précités sont bien adaptés pour les polypyrroles fonctionnalisés avec le groupement $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ en position 1 sur l'azote. Mais une électropolymérisation
 10 avec un pyrrole fonctionnalisé avec d'autres groupements sont aussi possibles. Par exemple $\text{Py}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$, $\text{Py}-\text{SH}$, Py -succinimidyl ester (en 3), Py -hydrazine avec une substitution en 1 sur l'azote ou en 3 sur le cycle pyrrole, permettant d'immobiliser les
 15 oligonucléotides, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un agent de réticulation, par exemple bi-fonctionnel.

Les agents de réticulation suivants peuvent donc être utilisés dans le procédé de la présente
 20 invention :

- a) un dialdéhyde du type glutaraldéhyde, qui peut réagir sur les fonctions NH_2 du film de polypyrrole (étape collective) puis sur la fonction NH_2 d'un oligonucléotide terminé par
 25 exemple par un phosphate portant un groupement aminé, par une étape individuelle dans les microcuvettes ;
- b) un diisothiocyanate qui peut également réagir sur la fonction amine du polypyrrole

fonctionnalisé par une extrémité (étape collective) puis sur une fonction amine d'un oligonucléotide terminé par un phosphate avec un groupement espaceur fonctionnalisé avec
5 NH_2 ;

c) un anhydride succinique qui par ouverture met en jeu deux fonctions acides capables de réagir sur les NH_2 du polypyrrole et d'autre part sur les NH_2 d'un oligonucléotide fonctionnalisé avec NH_2 .
10

Selon l'invention, la sonde biologique qui va être à l'origine de la spécificité de la biopuce fabriquée, peut être choisie par exemple parmi un oligonucléotide, un ADN, un ARN, un peptide, un
15 glucide, un lipide, une protéine, un anticorps, un antigène.

Selon l'invention la sonde biologique est de préférence fonctionnalisée pour pouvoir être fixée soit directement, soit indirectement sur le pyrrole fonctionnalisé. Cette fonctionnalisation a pour but de
20 fixer sur la sonde biologique un groupement chimique capable de former une liaison covalente entre la sonde biologique et le pyrrole fonctionnalisé.

Elle peut être par exemple fonctionnalisée avec
25 un groupement thiol, avec un groupement NH_2 , aldéhyde, un groupement $-\text{COOH}$ ou encore un groupement phosphate acide.

Par exemple lorsque la sonde biologique est un oligonucléotide, elle peut être fonctionnalisée avec un
30 groupement thiol (SH). Les oligonucléotides fonctionnalisés avec S-H peuvent être préparés selon une procédure connue, par exemple en fin d'une synthèse automatisée d'oligonucléotides.

Dans un cas où il est plus facile de disposer d'oligonucléotides fonctionnalisés avec NH_2 , il est possible par exemple de synthétiser un pyrrole fonctionnalisé avec un S-H pour la copolymérisation, d'utiliser par exemple SMPB avec ses deux fonctions
5 spécifiques et d'immobiliser les oligonucléotides fonctionnalisés avec NH_2 par liaison covalente avec la fonction succinamide de cet agent de réticulation.

Dans le cas d'oligonucléotides terminés en 3' par un nucléotide N-méthyl uridine, une réaction
10 d'oxydation sur cette fonction permet d'obtenir un oligonucléotide fonctionnalisé avec une fonction aldéhyde, capable de réagir directement, c'est-à-dire par exemple sans l'agent bifonctionnel sur le
15 polypyrrole fonctionnalisé avec NH_2 .

Pour fonctionnaliser un oligonucléotide avec une fonction NH_2 , l'une des méthodes utilisables selon le procédé de la présente invention peut consister à faire un couplage entre l'oligonucléotide et le
20 N-trifluoroacétyl-6 amino hexyl-2 cyanoéthyl NN'-diisopropyl phosphoramidite disponible dans le commerce.

Par ailleurs, un oligonucléotide fonctionnalisé avec NH_2 peut par exemple être converti en
25 oligonucléotide terminé par un thiol par une réaction avec le dithiobis (succinimidylpropionate).

Les oligonucléotides sondes fonctionnalisés peuvent par exemple être prélevés par micropipetage dans des micropuits et injectés dans les microcuvettes
30 par exemple par l'intermédiaire d'un microrobot dispenseur ou par impression par jets. Ces appareils sont bien connus de l'homme du métier.

Le procédé de la présente invention permet avantageusement de choisir le nombre de sondes par site actif, c'est-à-dire par microcuvette en jouant sur la proportion de pyrrole fonctionnalisé par rapport au
5 pyrrole.

La densité de sondes souhaitée peut être contrôlée par exemple par fixation d'oligonucléotides marquées en extrémité de chaînes par une biotine et en utilisant la reconnaissance par streptavidine-Cy3 par
10 une analyse de surface de la puce par les méthodes classiques de détection par fluorescence.

Un autre avantage du procédé de l'invention réside dans le fait que les deux opérations collectives, électropolymérisation et éventuellement
15 fixation de l'agent de réticulation, peuvent se faire par lots sur un grand nombre de plaquettes en parallèle.

Ainsi, le procédé de l'invention permet par
20 exemple de fabriquer une puce oligonucléotidique comprenant dans cet ordre :

- soit un substrat de silicium recouvert de silice, et d'une couche de silane fonctionnalisé avec des pyrroles,
- 25 - soit une couche d'or ou une couche silane présentant des sites pyrroles,
- soit une couche d'or avec ou sans une couche de promotion et d'adhérence de l'électropolymérisation (basée sur un pyrrole fonctionnalisé avec un thiol
30 -SH),
- soit une couche d'aluminium avec un pyrrole fonctionnalisé avec un -COOH,

- et une couche de résine dans laquelle des microcuvettes ont été réalisées de telle sorte que le fond desdites microcuvettes est constitué au moins en partie de la couche d'or ou de la couche de silane présentant des sites pyrroles,
- 5 - et une couche d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé, fixée sur la couche d'or ou la couche de silane présentant des sites pyrroles constituant le fond desdits microcuvettes, le
- 10 pyrrole fonctionnalisé étant lié ou non à un agent de réticulation bifonctionnel,
- et un oligonucléotide fixé directement sur le pyrrole fonctionnalisé, ou indirectement sur le pyrrole fonctionnalisé par l'intermédiaire de
- 15 l'agent de réticulation lié au pyrrole.

D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront encore à la lecture de la description qui suit, donnée bien entendu à titre

20 illustratif et non limitatif, en référence aux dessins en annexe.

Brève description des figures

- La figure 1 est un schéma d'une vue en coupe

25 d'un substrat structuré selon un premier mode de réalisation des étapes a) et b) du procédé de la présente invention.

- La figure 2 est un schéma d'une vue en coupe d'un substrat structuré selon le mode de réalisation

30 représenté sur la figure 1, et comprenant en outre un agent de réticulation pour une fixation indirecte d'une molécule biologique.

- La figure 3 est un schéma d'une vue en coupe d'un substrat structuré représenté sur la figure 2, illustrant la fixation indirecte d'un oligonucléotide sur l'agent de réticulation.

5 - La figure 4 est un schéma d'une vue en coupe d'un substrat structuré selon un second mode de réalisation du procédé de la présente invention.

10 - La figure 5 est un schéma d'une vue en coupe d'un substrat structuré selon un troisième mode de réalisation des étapes a) et b) du procédé de la présente invention.

EXEMPLES

15 Exemple 1 : Fabrication d'une biopuce constituée notamment d'oligonucléotides greffés sur un polymère conducteur selon un premier mode de réalisation de la présente invention.

20 Selon ce premier mode de réalisation, relatif notamment à l'étape a) du procédé de l'invention, une couche d'or est déposée sur une plaquette de silicium de manière à former une électrode de travail pour l'électropolymérisation d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé. Cette couche d'or est
25 déposée par une technique classique d'évaporation sous vide ou pulvérisation cathodique. Elle a une épaisseur d'environ 1000 à 5000 Å et constitue l'électrode de travail collective.

30 Une résine photosensible est déposée sur l'électrode en or et une étape de photolithographie permet de pratiquer des ouvertures dans la résine de manière à former des microcuvettes comportant

l'électrode de travail dans leur fond, ces microcuvettes peuvent être adressées simultanément.

La résine utilisée est de préférence :

- 5 a) une résine photosensible de type positif (Novolaque + diézonaphtoquinone à développement en milieu alcalin) ;
- b) une résine photosensible négative de type Polyimide (OLIN) à développement dans un solvant organique ;
- 10 c) soit un polymère gravé par gravure sèche ou humide.

Les microcuvettes formées ont une dimension de 100x100x30 μm .

15 La résine est déposée sur l'électrode en or par une technique classique de centrifugation à la tournette ("spinning"). Un substrat structuré selon l'étape a), du procédé de la présente invention est ainsi obtenu.

L'étape b) d'électropolymérisation collective 20 est réalisée en utilisant une solution de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé.

Dans cet exemple, le pyrrole fonctionnalisé est le N-éthylaminepyrrole, et la solution utilisée pour l'électropolymérisation est une solution 25 aqueuse/éthanol ou acétonitrile comprenant 0,1 mole de pyrrole, et un rapport molaire pyrrole fonctionnalisé/pyrrole de 5% à 0,5% en poids de pyrrole fonctionnalisé. Cette solution est appelée ci-après bain électrolytique.

30 L'obtention du monomère de pyrrole fonctionnalisé avec une fonction NH_2 est aisée et est décrite par exemple dans I. Jirkowsky, R. Baudy, Synthesis 1981, p. 481.

L'électropolymérisation est réalisée par trempage dans le bain électrolytique du substrat structuré obtenu précédemment, avec des réactifs appropriés pour l'électrochimie. Ces réactifs sont par exemple des sels électrolytiques ($\text{Li}^+\text{ClO}_4^-$, sels d'ammonium quaternaires, Li-toxylate, ou du polystyrène sulfonate de lithium, de potassium ou de sodium).

Les solvants pour l'électropolymérisation sont, par exemple, le CA_3CN , l'eau, l'éthanol et les mélanges eau-éthanol. Le pyrrole contenu dans le bain présente une concentration de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-3} M/l.

Une contre-électrode en platine et une électrode de référence au calomel trempent dans le bain électrolytique et sont indépendantes de la plaquette de silicium, seule l'électrode de travail est intégrée à la structure de la plaquette.

Un film de copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé est ainsi formé et déposé uniquement sur le fond des microcuvettes par électrodéposition.

La figure 1 est un schéma d'une vue en coupe du substrat obtenu selon ce premier mode de réalisation du procédé de la présente invention. Sur cette figure, la référence 1 se rapporte au substrat structuré formé dans cet exemple, constitué d'une plaquette de silicium 3, d'une couche d'or 5, et d'une couche de résine photosensible 7. La référence 9 se rapporte à la liaison de la couche d'or avec un générateur de courant électrique pour l'électropolymérisation, la référence 10 à une microcuvette, et les références 11 et 13 se rapportent au copolymère de pyrrole (référence 11) et de N-éthylamine pyrrole (référence 13) formé par électrodéposition sur la couche d'or 5 au fond de la microcuvette 10.

Dans cet exemple, l'étape c) de fixation de la molécule biologique est une étape de fixation indirecte. Elle comprend la fixation d'un agent de réticulation sur la fonction NH_2 du N-éthylamine pyrrole électrodéposé sur le fond des microcuvettes.

L'agent de réticulation utilisé dans cet exemple est le succinimidyl 4-(p-maléimidophényl) butyrate) (SMPB) décrit précédemment.

Cette fixation est réalisée en formant une liaison covalence entre la fonction NH_2 du pyrrole fonctionnalisé et la fonction succinate du SMPB.

Elle est réalisée par trempage du substrat précédemment formé dans une solution 10^{-3}M de SMPB dans un solvant (diméthylformamimide).

Le polypyrrole formé est insoluble dans cette solution et dans la majorité des solvants courants.

La figure 2 est un schéma d'une vue en coupe du substrat structuré ainsi obtenu. Sur ce schéma, la référence 1 se rapporte au substrat structuré représenté sur la figure 1, et la référence 15 se rapporte à l'agent de réticulation SMPB. Cette figure 2 montre aussi la réaction entre le groupe succinimide de l'agent de réticulation et la fonction amine du pyrrole.

On a donc réalisé dans cet exemple des microcuvettes recouvertes d'un polypyrrole présentant une fonctionnalisation de surface, grâce au SMBP, de groupements réactifs de type maléimide.

Ces groupements maléimide de SMBP permettent la fixation de la sonde biologique sur le film de polypyrrole précédemment électrodéposé.

La sonde biologique utilisée dans cet exemple est un mélange d'oligonucléotides fonctionnalisés avec un groupement thiol SH.

5 Les oligonucléotides ont été préparés par une synthèse automatisée classique, et fonctionnalisés avec un groupement thiol. Les oligonucléotides fonctionnalisés sont prélevés par micropipetage dans des micropuits et injectés dans les microcuvettes par l'intermédiaire d'un microrobot dispenseur.

10 La figure 3 est un schéma d'une vue en coupe du substrat structuré représenté sur la figure 2, illustrant la fixation de l'oligonucléotide sur l'agent de réticulation. Sur cette figure, la référence 1 se rapporte au substrat structuré formé dans cet exemple, 15 les références 11 et 13, comme sur les figures 1 et 2, se rapportent au copolymère de pyrrole et de N-éthylamine pyrrole, la référence 15 à l'agent de réticulation SMBP représenté sur la figure 2 et la référence 17 se rapporte à un oligonucléotide. Cette 20 figure 3 montre aussi la réaction entre la fonction maléimide de l'agent de réticulation et l'oligonucléotide -SH.

La densité de sonde a été analysée par fixation d'oligonucléotides marqués par une biotine (référence 25 19 sur la figure 3) et en utilisant une reconnaissance par la streptavidine Cy3 (référence 21 sur la figure 3).

L'analyse a été réalisée par une méthode classique de détection par fluorescence, appliquée au 30 couple biotine-streptavidine.

Exemple 2 : Fabrication d'une biopuce constituée notamment de sondes d'oligonucléotides greffées sur un polymère conducteur selon un second mode de réalisation du procédé de la présente invention.

- 5 Selon ce deuxième mode de réalisation, relatif notamment à l'étape a) du procédé de l'invention, une résine photosensible négative est déposée sur une plaquette de silicium recouverte d'un film naturel de SiO_2 .
- 10 Comme dans l'exemple 1, des microcuvettes sont alors formées par photolithographie de telle manière que le fond des microcuvettes, appelées aussi ci-après sites, soit constitué par la couche d'oxyde de silicium.
- 15 On procède ensuite à une fonctionnalisation des sites par silanisation : cette fonctionnalisation est une étape collective du procédé de l'invention, elle est réalisée par trempage de la plaquette de silicium comportant les microcuvettes formées précédemment dans
- 20 une solution d'un agent de silanisation fonctionnalisé avec un pyrrole dans un solvant approprié. L'agent de silanisation est le N-(3-(triméthoxysilyl)propyl) pyrrole, et le solvant est un mélange éthanol/eau (95/5) ou du toluène.
- 25 On obtient sur le fond des microcuvettes, ou sites, une monocouche de silane présentant un alignement régulier de sites pyrrole.
- Cette monocouche est capable d'initier et de promouvoir l'adhésion d'un film de polypyrrole par
- 30 électropolymérisation : elle forme une électrode de travail pour l'électropolymérisation collective du procédé de la présente invention.

L'électropolymérisation sur une telle monocouche est par exemple décrite dans l'article de R. Simon et Coll; J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 2031.

5 L'étape suivante est l'étape b) du procédé de l'invention, d'électropolymérisation d'un copolymère de pyrrole et de N-éthylamine pyrrole noté ci-après Py et Py-R-F, où R et F sont respectivement un groupement espaceur et une fonction chimique réactive.

10 La plaquette de silicium fonctionnalisée par le silane pyrrole constitue en fait l'anode d'une cellule d'électrolyse. Elle est plongée dans un bain électrolytique approprié, contenant les deux polymères, une contre-électrode et une électrode de référence.

15 Le bain électrolytique comprend outre Py et Py-R-F des sels électrolytiques de Li^+ dans un solvant eau/éthanol ou acétonitrile.

20 La contre-électrode est une électrode de platine. Au cours de l'électropolymérisation, les noyaux pyrrole et pyrrole substitué viennent s'insérer et se lier aux motifs pyrrole de la monocouche de silane.

La figure 4 en annexe illustre le produit ainsi obtenu, elle montre aussi la formation de liaisons covalentes entre les différents cycles pyrrole.

25 Sur cette figure, la référence 32 se rapporte à la plaquette de silicium, la référence 34 à la couche de résine photosensible, la référence 35 à une microcuvette, la référence 36 à la monocouche de silane, et la référence 38 à la couche de copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé.

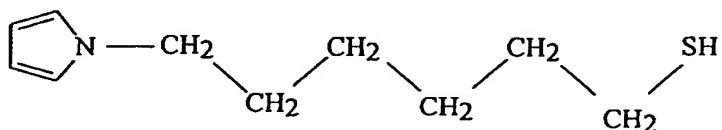
30 La fabrication de la biopuce est achevée comme dans l'exemple 1 :

- réactions avec l'agent de réticulation bifonctionnel : étape collective,
- immobilisation des sondes d'oligonucléotides fonctionnalisés avec un groupement thiol (-S-H) par adressage mécanique avec un robot par impression à jets de liquide (tête piézoélectrique) de type GESIM ou avec un robot de type BROWN.

Exemple 3 : Fabrication d'une biopuce constituée notamment de sondes d'oligonucléotides greffés sur un polymère conducteur selon un troisième mode de réalisation du procédé de la présente invention.

Dans cet exemple de réalisation du procédé de la présente invention, les microcuvettes ont été réalisées par photolithographie d'une résine déposée sur une électrode d'or à la surface d'une plaquette de silice comme dans l'exemple 1 précédent.

Il a ensuite été procédé à une thiolisation de la couche d'or au fond des microcuvettes par un pyrrole fonctionnalisé avec un groupement -SH de formule suivante :



La réaction a été réalisée par trempage de la plaquette précitée dans une solution contenant le pyrrole fonctionnalisé avec un thiol dans un solvant comme le diméthylformamide (DMH) par exemple.

Le thiol s'est accroché sur l'or au fond des microcuvettes pour former une monocouche de pyrrole.

L'ensemble couche d'or et pyrrole fixé sur celle-ci formant une électrode de travail pour l'électropolymérisation collective de l'étape b) du procédé de l'invention. En fait, l'échantillon sert
5 d'anode pour l'amorçage collectif de l'électropolymérisation.

Les étapes b) et c) du procédé de l'invention ont alors été réalisées comme dans les exemples 1 et 2 précédents.

10 La figure 5 en annexe est un schéma illustrant le produit obtenu dans cet exemple. Il s'agit d'une vue en coupe d'un substrat structuré 40 comprenant une plaquette de silicium 42, une couche d'or 44, une couche de résine 46 photosensible dans laquelle sont
15 formées des microcuvettes 48, une monocouche de pyrrole 50 accrochée sur l'or au fond des microcuvettes, et un film 52 de copolymère de pyrrole (Py) et de pyrrole

F
|

fonctionnalisé (—Py—). Sur cette figure, les flèches courbes indiquent l'électrodéposition du film
20 précité sur le pyrrole 50 fonctionnalisé accroché par des groupements thiol sur l'or au fond des microcuvettes.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication d'une biopuce constituée notamment de sondes biologiques greffées sur un polymère conducteur, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 5 a) structuration d'un substrat de manière à obtenir sur ce substrat des microcuvettes comprenant dans leur fond une couche d'un matériau capable d'initier et de promouvoir l'adhésion sur celle-ci d'un film d'un
 - 10 copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé par électropolymérisation,
 - b) électropolymérisation collective, de manière à former un film électropolymérisé d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé sur le fond
 - 15 desdites microcuvettes, sur la couche dudit matériau, à partir d'une solution de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé, en présence de réactifs chimiques appropriés pour ladite électropolymérisation,
 - 20 c) fixation directe, ou indirecte, d'une sonde biologique sur le pyrrole fonctionnalisé, par injection d'une solution de la sonde biologique, au choix dans une ou plusieurs microcuvette(s) en présence de réactifs chimiques nécessaires à la
 - 25 fixation directe, ou indirecte, de cette sonde biologique sur le pyrrole fonctionnalisé.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la couche du matériau capable d'initier et de promouvoir l'adhésion du film de polypyrrole par
- 30 électropolymérisation étant une couche métallique, l'étape a) comprend une étape de dépôt de ladite couche métallique sur le substrat, et une étape de dépôt d'une

couche de résine sur la couche métallique et de gravure de ladite couche de résine de manière à former les microcuvettes dont le fond est constitué au moins en partie de la couche métallique.

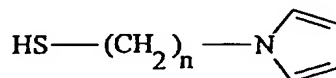
5

3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel la couche métallique est une couche d'or.

4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, dans lequel l'étape a) comprend en outre, une étape de traitement chimique de la couche d'or au fond des microcuvettes en présence d'un pyrrole fonctionnalisé avec un groupement thiol de manière à former une monocouche de pyrrole sur ladite couche d'or, au fond desdites microcuvettes.

15

5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel le pyrrole fonctionnalisé avec un groupement thiol a la formule chimique suivante :



20

dans laquelle n a une valeur allant de 2 à 10.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel le substrat est une plaquette de silicium.

25

7. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le substrat est une plaquette de silicium et dans lequel la couche capable d'initier et de promouvoir l'adhésion sur celle-ci du film de polypyrrole par électropolymérisation étant une couche

30

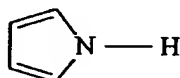
de silane présentant un alignement de sites pyrrole, l'étape a) comprend une étape de dépôt d'une couche de résine sur la plaquette de silicium, ladite plaquette de silicium étant recouverte d'un film de SiO_2 , et de
5 gravure de ladite couche de résine de manière à former les microcuvettes dont le fond est constitué au moins en partie du film de SiO_2 ; et une étape de traitement des microcuvettes au moyen d'un agent de silanisation fonctionnalisé avec un pyrrole de manière à fixer sur
10 le film de SiO_2 , dans le fond des microcuvettes, la couche de silane présentant un alignement de sites pyrroles.

8. Procédé selon la revendication 7, dans
15 lequel l'agent de silanisation est choisi dans un groupe comprenant le N-(3-(triméthoxy silyl)propyl) pyrrole, ou tout autre pyrrole fonctionnalisé avec un groupement $-\text{SiCl}_3$ ou $-\text{Si}(\text{OMe})_3$.

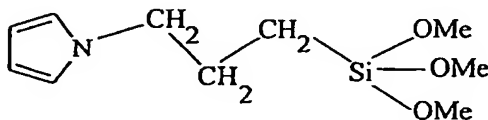
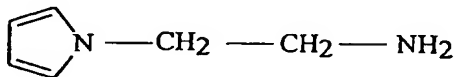
9. Procédé selon l'une quelconque des
20 revendications 1 à 8, dans lequel l'électropolymérisation collective est réalisée par trempage du substrat structuré obtenu à l'étape a) dans un bain électrolytique comprenant une solution de
25 pyrrole, de pyrrole fonctionnalisé, et de réactifs chimiques appropriés pour l'électropolymérisation, en présence d'une contre-électrode qui trempe dans le bain électrolytique et est indépendante du substrat structuré, la couche de matériau capable d'initier et
30 de promouvoir l'adhésion sur celle-ci du film de copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé formant une électrode de travail.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel le pyrrole fonctionnalisé est un pyrrole comportant un groupement choisi dans un ensemble comprenant un groupement NH₂,
5 un groupement thiol, un groupement ester de la N-hydroxysuccinimide, un groupement triméthoxy silyl, un groupement carboxylique, aldéhyde, isothiocyanate.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 dans lequel le pyrrole fonctionnalisé est choisi parmi un des composés suivants :



15



20



comportant une première fonction permettant sa fixation sur le pyrrole fonctionnalisé, et une deuxième fonction permettant la fixation de la sonde biologique sur ledit agent de réticulation.

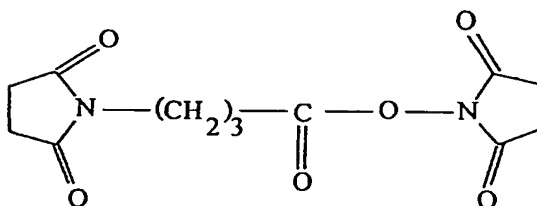
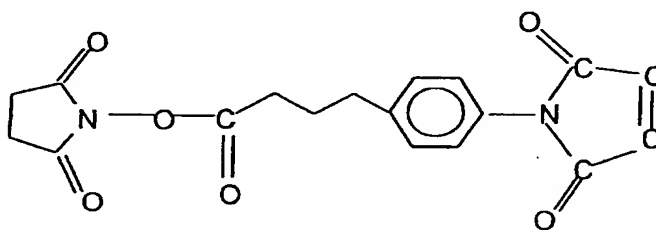
5

13. Procédé selon la revendication 12, dans lequel l'agent de réticulation est choisi dans un ensemble comprenant un dialdéhyde, un diisothiocyanate, un diacide, un anhydride succinique, ou un dérivé de ces composés.

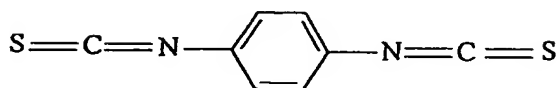
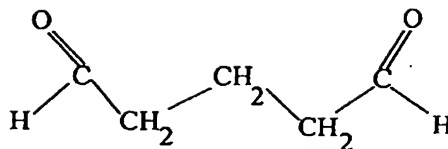
10

14. Procédé selon la revendication 12, dans lequel l'agent de réticulation est choisi parmi un des composés suivants :

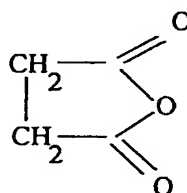
15



20



5



10 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la sonde biologique est choisie parmi un oligonucléotide, un ADN, un ARN, un peptide, un glucide, un lipide, une protéine, un anticorps, un antigène.

15

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, dans lequel la sonde biologique est un oligonucléotide fonctionnalisé pour être fixé soit directement, soit indirectement sur un pyrrole fonctionnalisé.

20

17. Procédé selon la revendication 16, dans lequel l'oligonucléotide est fonctionnalisé avec un groupement thiol.

18. Puce oligonucléotidique comprenant dans cet ordre :

- un substrat de silice,
- 5 - une couche d'or ou une couche silane présentant des sites pyrroles,
- une couche de résine dans laquelle des microcuvettes ont été réalisées de telle sorte que le fond desdites microcuvettes est constitué au moins en
- 10 partie de la couche d'or ou de la couche de silane présentant des sites pyrroles,
- une couche d'un copolymère de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé, fixée sur la couche d'or ou la
- 15 couche de silane présentant des sites pyrroles constituant le fond desdits microcuvettes, le pyrrole fonctionnalisé étant lié ou non à un agent de réticulation bifonctionnel, et
- un oligonucléotide fixé directement sur le pyrrole fonctionnalisé, ou indirectement sur le pyrrole
- 20 fonctionnalisé par l'intermédiaire de l'agent de réticulation lié audit pyrrole.

113

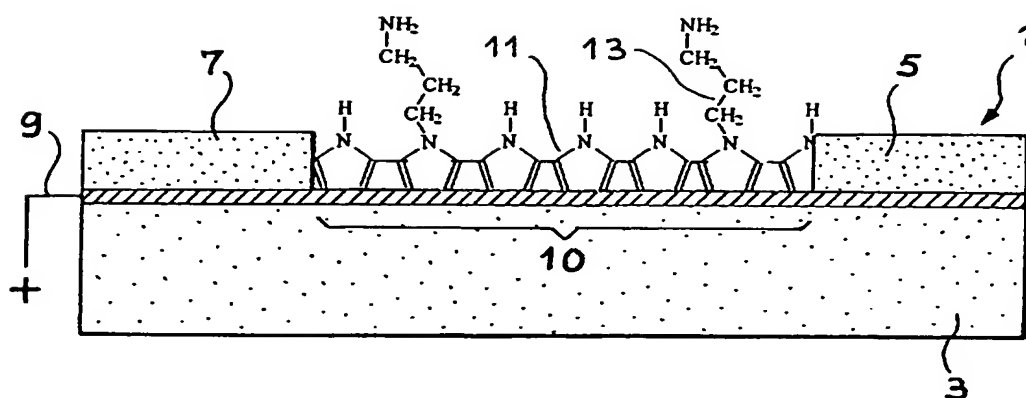


FIG. 1

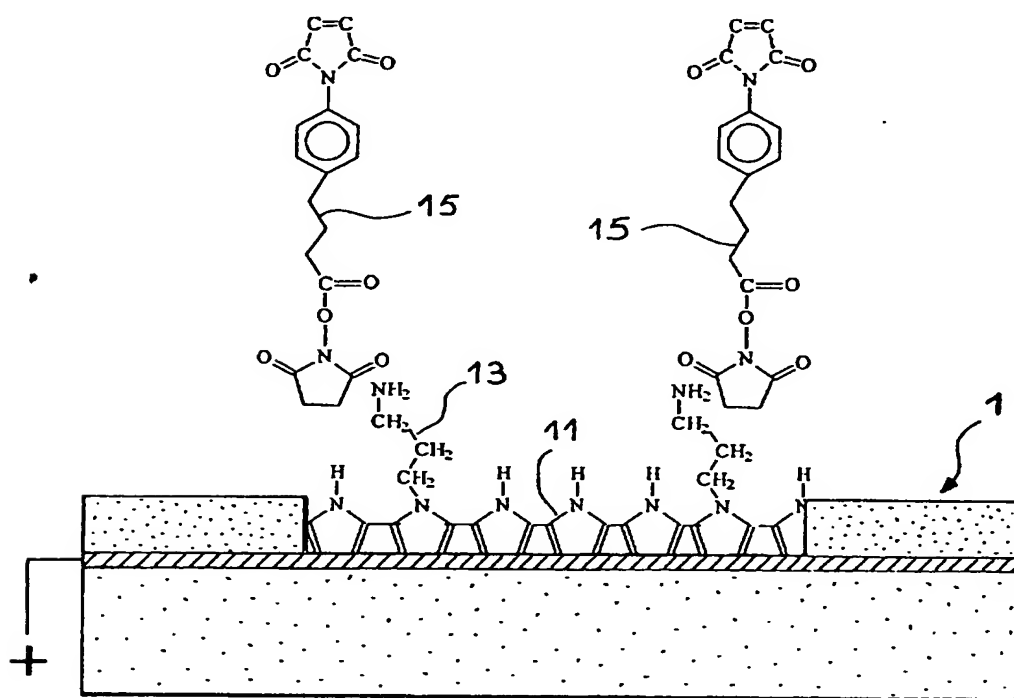


FIG. 2

י"ח. י"ח.

“**THE** **THEIR**”



REPUBLIQUE FRANÇAISE

2787582

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 568740
FR 9815883

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US 5 837 859 A (ROGET ANDRE ET AL) 17 novembre 1998 (1998-11-17)	1-5, 9-16, 18
Y	* le document en entier *	7
X	LIVACHE T ET AL.: "Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 15, 1994, pages 2915-2921, XP002114812	1,4,5, 9-13, 15, 16, 18
X	LIVACHE T ET AL.: "Polypyrrole DNA chip on a silicon device: Example of hepatitis C virus typing" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 255, 1998, pages 188-194, XP002114813	1,2,18
Y	* abrégé * * page 188, colonne 1, alinéa 1 - page 190, colonne 1, alinéa 1; figures 1,2 * * page 191, colonne 1, alinéa 1 - page 192, colonne 2, alinéa 3 *	5,7,9
Y	EP 0 229 993 A (POLAROID CORP) 29 juillet 1987 (1987-07-29)	1-3,5-7, 9-11,18
Y	US 5 653 939 A (KOSICKI BERNARD B ET AL) 5 août 1997 (1997-08-05)	1-3
Y	* abrégé * * colonne 11, ligne 11 - ligne 65; revendications 1-9; figures 15,16,21,22 *	
Y	EP 0 588 721 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 23 mars 1994 (1994-03-23)	1,2,6
	* le document en entier *	
	-/-	
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
9 septembre 1999		Knehr, M
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1
EPO FORM 1503 03.82 (P/C13)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	US 5 810 989 A (KRIHAK MICHAEL ET AL) 22 septembre 1998 (1998-09-22) * le document en entier *	1,2,9
D,Y	SIMON R A ET AL.: "Synthesis and characterization of a new surface derivatizing reagent to promote the adhesion of polypyrrole films to n-type silicon photoanodes: N-(3-(Trimethoxysilyl)propyl)pyrrole" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 104, 1982, pages 2031-2034, XP002114814 * le document en entier *	7,8,10, 11
Y	GUISEPPI-ELIE A AND WILSON A M: "Specific immobilization of electropolymerized polypyrrole thin films onto interdigitated microsensor electrode arrays" LANGMUIR, vol. 11, 1995, pages 1768-1776, XP002114815 * abrégé *	7,8,10, 18
A	NISHIZAWA M ET AL.: "Electrochemical preparation of ultrathin polypyrrole film at microarray electrodes" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY, vol. 95, 1991, pages 9042-9044, XP002114816 * le document en entier *	
A	EP 0 659 794 A (LORRAINE LAMINAGE) 28 juin 1995 (1995-06-28) * le document en entier *	
-/-		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
9 septembre 1999		Knehr, M
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 568740
FR 9815883

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP 0 038 244 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 21 octobre 1981 (1981-10-21) * le document en entier *	
P,X	BIDAN G ET AL.: "Conducting polymers as a link between biomolecules and microelectronics" SYNTHETIC METALS, vol. 102, 1999, pages 1363-1365, XP002114817 * le document en entier *	1,18
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
9 septembre 1999		Knehr, M
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		